

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski studij biologije

Emerik Galić

Telomere – starenje i rak

Završni rad

Mentorica: Doc. dr. sc. Ivna Štolfa Čamagajevac

Osijek, 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju

Završni rad

Preddiplomski studij biologije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

TELOMERE – STARENJE I RAK

Emerik Galić

Mentor: Dr.sc. Ivna Štolfa Čamagajevac, docent

Kratak sažetak završnog rada:

Telomere su jedinstvene strukture na krajevima kromosoma potrebne za genetsku stabilnost stanice. Pri replikaciji stanične DNA dolazi do skraćivanja telomera zbog uklanjanja zadnje početnice na tromom lancu i nemogućnosti polimerizacije „*de novo*“ krajeva kromosoma pomoću DNA polimeraze. Za spriječavanje kritičnog gubitka telomera, odgovoran je enzim telomeraza. Telomere i telomeraza su važne u biologiji tumora i starenja. Mjerenje aktivnosti telomeraze se koristi u dijagnostici tumora, dok se njena inhibicija pokazala kao nova metoda u liječenju tumora. Skraćivanjem telomera u normalnih stanica dolazi do senescencije. Ekspimiranjem telomeraze je moguće produljiti telomere te produžiti životni vijek stanice. Modernim istraživanjima se pokušava isto postići na razini cijelog organizma.

Broj stranica: 14

Broj slika: 2

Broj tablica: 1

Broj literaturnih navoda: 16

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: telomere, telomeraza, stanica, kromosomi, rak, starenje

Rad je pohranjen u: knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku, te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek, Department of Biology

Bachelor's thesis

Undergraduate study in Biology

Scientific Area: Natural science

Scientific Field: Biology

TELOMERES IN CANCER AND AGING

Emerik Galić

Supervisor: Ph. D. Ivna Štolfa Čamagajevac, assistant professor

Short abstract: Telomeres are unique structures at the ends of the chromosomes crucial for genetic stability of the cell. Telomeres shorten in the process of DNA replication due to inability of the DNA polymerase to synthesise DNA chain „*de novo*“. Telomere synthesizing enzyme is called telomerase. Telomeres and telomerase are important in cancer biology and aging. Telomerase activity measurement can be used in cancer diagnosis. Telomerase inhibition can be effective method in cancer therapy. Telomere shortening in normal cells leads to senescence. Telomerase expression can lead to telomere elongation, which in term can lead to extended life span. Recent investigations aim to achieve these characteristics on the entire organism scale.

Number of pages: 14

Number of figures: 2

Number of tables: 1

Number of references: 16

Original in: Croatian

Keywords: telomeres, telomerase, cell, chromosome, cancer, senescence

Thesis deposited in: Library of Department of Biology, University of J. J. Strossmayer Osijek and in National University Library in Zagreb in electronic form. It is also available on the web site of Department of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek.

Sadržaj

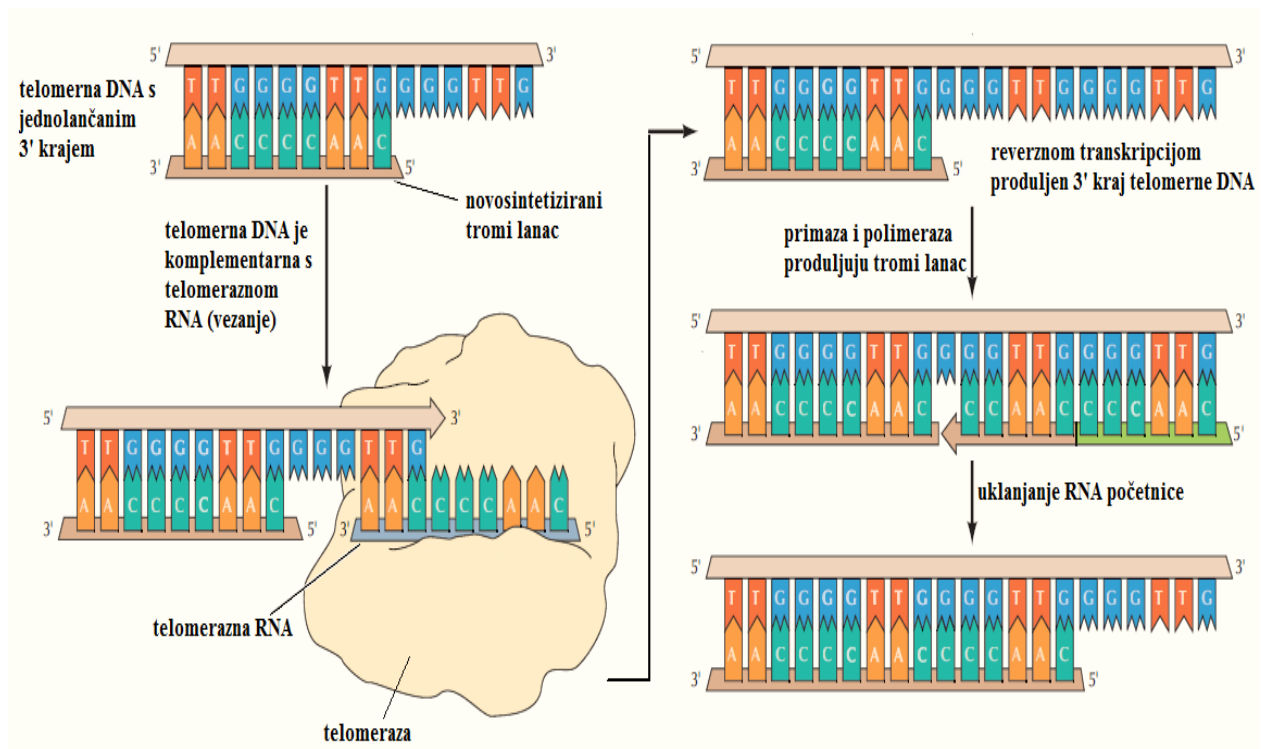
1. Uvod	5
2. Osnovni dio	6
2.1. Telomere, telomerase i rak	6
2.2. Skraćivanje telomera kao glavni uzrok starenja	10
2.3. Stanična proliferacija i telomeraza	11
3. Zaključak	12
4. Literatura	13

1. UVOD

Slijedovi na krajevima eukariotskih kromosoma, telomere, igraju značajnu ulogu u replikaciji i održavanju kromosoma. Telomerni slijedovi DNA različitih eukariota slični su i sadržavaju ponovljene jednostavne slijedove DNA s nakupinama G ostataka u jednom lancu, primjerice, slijed telomernih ponavljanja u čovjeka i ostalih sisavaca je slijed AGGGTT, a telomerno ponavljanje u praživotinji *Tetrahymena* je slijed GGGGTT. Ovi su slijedovi ponovljeni stotinama ili tisućama puta, pa zauzimaju nekoliko kilobaza i završavaju jednolančanim repom. Ponovljeni slijedovi telomerne DNA čine omče na krajevima kromosoma te ujedno vežu određeni broj proteina koji čuvaju kromosomske krajeve od razgradnje ili međusobnog spajanja.

Telomere igraju glavnu ulogu u replikaciji krajeva linearne DNA molekule. DNA-polimeraza može produljiti rastući DNA lanac, ali ne može započeti sintezu novoga lanca na kraju linearne DNA molekule. Prema tome, krajevi linearnih kromosoma ne mogu se replicirati normalnom aktivnošću DNA-polimeraze. (Cooper, 2004).

Telomeraza je enzim ključan za održavanje odnosno replikaciju krajnjih slijedova linearnih eukariotskih kromosoma (Slika 1). Terminalni dijelovi kromosoma koji se sastoje od uzastopnih ponavljanja jednostavnih slijedova DNA nazivaju se telomere. Krajnje 5' dijelove linearnih molekula DNA nije moguće produljiti djelovanjem DNA-polimeraza koje sintetiziraju DNA molekulu isključivo u 5'→3' smjeru stoga se za održavanje telomera koristi enzim telomeraza koji je sposoban replicirati krajnje slijedove DNA u odsutnosti kalupa. Telomeraza je eukariotski ribonukleoprotein (RNP) koji se sastoji od dvije podjedinice: RNA molekule kao kalupa za sintezu molekule DNA i proteinske podjedinice nazvane reverzna transkriptaza. Procesom reverzne transkripcije odnosno sinteze molekule DNA prema RNA kalupu, ovaj enzim održava stabilnu duljinu telomera stanica tumora (Cooper, 2004). Ključna uloga telomera u starenju je pokazana kod bolesnika s 50 % normalne razine telomeraze, što je rezultat mutacija na jednom od gena koji kodiraju telomerazu (Aubert i Lansdorp, 2008).



Slika 1. Mehanizam djelovanja telomeraze (Cooper, 2004).

2. OSNOVNI DIO

2.1. TELOMERE, TELOMERAZE I RAK

Veza između biologije telomera i onkogeneze prvi put je predložena kada se otkrilo da je ekspresija telomeraze znak raka kod ljudi. U 90 % uzoraka tumora je detektirana ekspresija ili prekomjerna ekspresija telomeraze (Shay i Roninson, 2004). Čini se da nedostak telomeraze i rak leže na suprotnim krajevima spektra (Donehower, 2002). U stanicama raka je visoka ekspresija telomeraze, dok je ekspresija u normalnim stanicama niska. Pokazalo se da je progresivno ranije pojavljivanje karcinoma kod LFS sindroma (Li-Fraumeni sindrom) povezano sa smanjenjem duljine telomera u svakoj generaciji, čime se otkrio prvi biološki marker za kliničko praćenje LFS bolesnika (Tabori i suradnici, 2007). Telomeraze se mogu primijeniti u dijagnostici raka te u liječenju raka. Tri su potencijalne koristi u dijagnostici raka (Holt i Shay, 1999). Telomerazna aktivnost može poslužiti u ranoj detekciji raka, prije progresije u maligni oblik. U 15% uzoraka predkarcinomskih lezija je detektirana aktivnost telomeraze, ali su klasificirane kao benigne lezije (Tablica 1.). Prisutnost aktivne telomeraze

može značiti da se u benignim cistama nalaze maligne stanice koje nisu otkrivene konvencionalnim metodama i prema tome procijeniti rizik od razvitka malignog tumora. Detekcija aktivne telomerase se može iskoristiti i u prognozi uspješnosti liječenja. Kod dječjeg neuroblastoma, tumori koji imaju visoku razinu telomerase imaju lošu prognozu ishoda liječenja, odnosno vjerojatno je da neće doći do regresije tumora. Kod podtipova neuroblastoma koji pokazuju nisku razinu mjerene telomerase, pokazalo se da dolazi do spontane regresije tumora. Bez telomerase, dolazi do skraćivanja telomera u stanicama tumora, te posljedično do senescencije i smrti tumorskih stanica. Treća potencijalna korist mjerenja aktivnosti telomerase u uzorcima tumora je otkrivanje mikrometastaza u okolnom netumorskom tkivu. Telomerazna aktivnost je detektirana u 10 % uzoraka biopsije područja koja su očišćena od tumora. Ovi podaci dovode do zaključka da postoje mikrometastaze u okolnom tkivu koje se ne mogu detektirati konvencionalnim citološkim metodama (Holt i Shay, 1999).

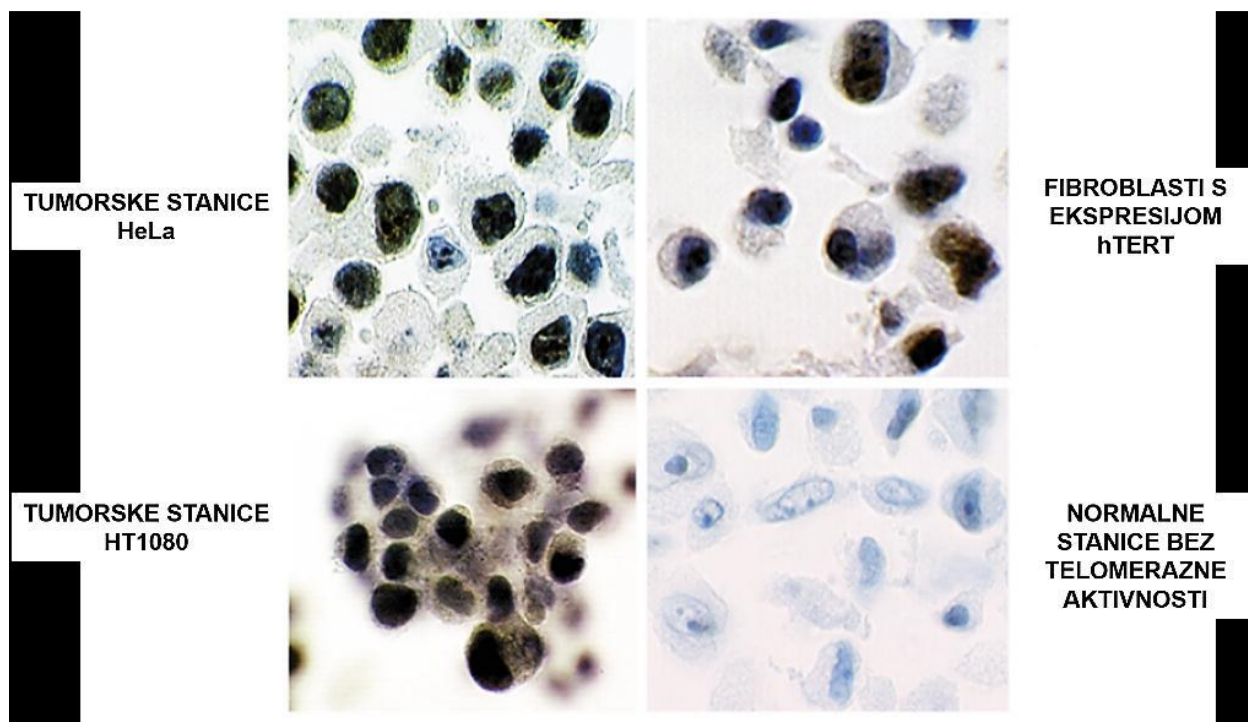
Tablica 1. Izmjerene aktivnosti telomerase u ljudskih tumora (Holt i Shay, 1999).

Pathology	No. positive/no. tested	Telomerase positive (%)
Normal*	1/196	0.5
Preinvasive (benign)	125/410	30
Malignant	1,734/2,031	85
Adjacent to malignant	77/660	11

Reverzna transkriptaza (hTERT) koja je dio strukture telomerase je ključan čimbenik u aktivnosti telomerase i razvoju tumora. Distribucija hTERT proteina istražena je imunohistokemijskim metodama u fibroblastima i stanicama tumora (Slika 2). Stanice tumora i normalni fibroblasti pokazuju povećanu ekspresiju gena za hTERT dok taj protein nije pronađen u normalnim stanicama. U ostalim tkivima, ekspresija hTERT gena je ograničena na matične stanice. Metodom imunolokalizacije hTERT-a u uzorcima odraslih tumora otkriveno

je da razina aktivnosti telomeraze ovisi o broju tumorskih stanica u uzorku. U tumorima s visokom koncentracijom telomeraze, visoka je detekcija hTert komponente u stanicama (Shay i sur., 2001).

Telomeraza se može primijeniti i u dijagnostici raka mjehura gdje konvencionalne citološke metode nisu učinkovite. U gotovo 90% uzoraka raka mjehura je detektirana aktivnost telomeraze, što bi moglo poslužiti kao obećavajuća metoda u otkrivanju ovog tipa raka. Gotovo 50% ranih faza raka mjehura ne bude otkriveno jer ne postoje učinkovite tehnike za njihovu detekciju (Holt i Shay, 1999).



Slika 2. Tumorske stanice i fibroblasti imaju povećanu ekspresiju telomerazne (hTERT) komponente, u normalnim stanicama nije eksprimirana telomeraza (Shay i sur., 2001).

Budući da je u 85% uzoraka tumora, detektirana aktivna telomeraza, kritična za proliferaciju tumorskih stanica, pokazalo se da je moguća meta za njenu inhibiciju u tumorima koja bi dovela do uništavanja stanica tumora. Istraživana su tri tipa inhibicije telomeraze. Inhibicija kromosomskom fuzijom, inhibicija RNA podjedinice telomeraze „*antisense*“ nukleotidnim slijedom, te inhibicija proteinske podjedinice reverzne transkriptaze. Inhibicija kromosomskom fuzijom je istraživana na stanicama raka bubrega. U te stanice je uveden zdravi kromosom 3 koji je doveo do skraćivanja duljina telomera te represije telomerazne aktivnosti.

Iz ovih podataka se može zaključiti da se na kromosomu 3 nalazi funkcionalni represor telomeraze i da represijom telomerazne aktivnosti u stanicama raka bubrega, dolazi do skraćivanja telomera, senescencije te smrti tumorskih stanica. Inhibicija telomeraze „*antisense*“ nukleotidnim slijedom može kao cilj imati samu RNA podjedinicu telomeraze ili mRNA transkript gena za telomerazu, na koji se veže „*antisense*“ nukleotid. Nastaje dvostruka mRNA koja se ne može translirati. Inhibicija proteinske telomerazne podjedinice je postignuta raznim kemijskim inhibitorima koji su toksični za stanicu (Holt i Shay, 1999).

Inhibicija telomerazne aktivnosti bi bila potencijalno učinkovita kod pacijenata s minimalnim ostacima tumora. Kod pacijenata s većim tumorima, ovaj pristup ne bi bio učinkovit. Telomerazni inhibitori moraju imati visoku specifičnost i minimalnu toksičnost za organizam. Primjena inhibitora telomeraze mogla bi se primjenjivati u kombinaciji s kirurškim odstranjivanjem tumora i kemoterapijom odmah nakon zahvata, u trenutku kada je najmanje tumorskih stanica u organizmu. Inhibitori bi se mogli koristiti i kada nema kliničke potvrde o ostacima tumora da bi se spriječilo nastajanje ranije spomenutih mikrometastaza. To bi bio potencijalan novi način prevencije povratka tumora (Shay i sur., 2001).

Inhibitori telomeraze bi mogli imati negativan utjecaj na normalne stanice koje eksprimiraju telomerazu. To su matične stanice i reproduktivne stanice. Matične stanice ulaze u diobu samo povremeno. U fazama kada nema diobe, telomeraza nije eksprimirana i ne dolazi do skraćivanja telomera. Na temelju ovih pretpostavki, smatra se da bi štete uzrokovane telomeraznim inhibitorima bile minimalne. Nakon smrti tumorskih stanica, inhibicijska terapija bi prestala, što bi dovelo do vraćanja telomerazne aktivnosti reproduktivnih i matičnih stanica. Cilj inhibicijske terapije je kritično skratiti telomere tumorskih stanica, što bi dovelo do njihove smrti, prije nego se telomere skrate u normalnih stanica (Shay i sur., 2001).

2.2. SKRAĆIVANJE TELOMERA KAO GLAVNI UZROK STARENJA

Ljudske stanice smještene u kulturi tkiva prestaju se dijeliti nakon ograničenog broja staničnih dioba, procesom replikativnog starenja (Hayflick i Moorhead, 1961; Hayflick, 1965). Prosječna duljina telomera spolnih kromosoma u stanicama spermija je mnogo dulja nego u odraslih stanica. To je prvo zapažanje koje je direktno povezalo duljinu telomera sa starenjem (Cooke i Smith, 1986). Razmatrana je mogućnost da odrasle stanice mogu imati nedostatak enzima telomeraze koja je otkrivena u jednostaničnom organizmu *Tetrahymena* (Greider i

Blackburn, 1985). U istraživanjima povezanosti skraćivanja telomera i starenja bilo je kritično odrediti je li skraćivanje telomera uzrok starenja ili je samo u korelaciji sa starenjem, te kakav je utjecaj skraćivanja telomera na razini tkiva i cjelokupnog organizma (Hornsby, 2006). Pri kloniraju ovce Dolly prijenosom jegre stanice mliječne žlijezde odrasle jedinke u jajnu stanicu, primjećeno je prerano starenje kloniranog organizma, što je dovedeno u vezu sa skraćivanjem telomera (Shiels i sur., 1999). Postoje istraživanja koja potvrđuju skraćivanje telomera kao uzrok starenja, ali i koja odbacuju takvu hipotezu. Trebalo je provjeriti je li telomeraza ekprimirana izvan stanice, sposobna održavati duljinu telomera te produžiti životni vijek stanice. Bodnar i sur. (1997) su dokazali da su klonovi epitelnih stanica i fibroblasta u kojima se eksprimira telomeraza, sposobni održavati ili čak produljiti duljinu telomera te produžiti životni vijek stanice. To je bio direktan eksperimentalni dokaz da ekspresija telomerase u normalnim stanicama sprječava senescenciju (starenje) stanice, te da je propadanje telomera molekularni mehanizam koji kontrolira starenje. Normalne klonirane stanice s vanjski unesenom telomerezom su utrostručile svoj životni ciklus, te su na biokemijskoj razini gotovo identične mladim normalnim stanicama, što pokazuje da održavanjem duljine telomera stanica dulje živi, ali i ostaje mlada. Modernim istraživanjima se takve karakteristike pokušavaju ostvariti u cijelom organizmu, ne samo na staničnoj razini (Holt i Shay, 1999).

Skraćene duljine telomera su primjećene kod primatelja pri alogenoj transplantaciji koštane srži u usporedbi s duljinama telomera u stanicama donora. Redukcija telomera je u negativnoj korelaciji s brojem presađenih stanica, dakle, što je manje stanica transplantirano, veća je redukcija duljine telomera. Moguće objašnjenje ove pojave je da broj dioba matičnih stanica za vrijeme transplantacije u primatelja dovodi do gubitka telomerne DNA. Gubitak telomera zbog stalnih dioba može utjecati na pojavu bolesti hematopoetskog tkiva u starijoj dobi. Također može objasniti i pojavu sekundarnih malignih stanja hematopoetskog sustava, koja je veća kod primatelja koštane srži u usporedbi s kontrolnom grupom jednake starosti. Na temelju ovih saznanja, moguće je zaključiti da matične stanice koštane srži nemaju sposobnost potpune regeneracije, te da je važan parametar pri transplantaciji broj stanica presađen u primatelja. Pokazano je i da je moguće produžiti telomere „*ex-vivo*“ prije presađivanja stanica u primatelja.

Napravljena su i istraživanja koja odbacuju hipotezu da je telomeraza glavni uzrok starenja. Wang i sur. (1998) nisu dokazali da je telomeraza odgovorna za starenje. U njihovom istraživanju stanice s induciranom ekspresijom telomerase nisu bile sposobne održavati duljinu telomera i spriječiti senescenciju, dok su stanice divljeg tipa s aktivnom telomerezom to bile

sposobne. Ovo istraživanje ukazuje na to da samo prisustvo aktivne telomerase ne znači i sposobnost održavanja dužine telomera i produženje životnog ciklusa stanice.

2.3. STANIČNA PROLIFERACIJA I TELOMERAZA

Budući da se gubitak telomerne DNA događa za vrijeme stanične diobe, pretpostavka je da stanice koje se ne dijele, ne bi trebale ekspimirati telomerazu, dok bi one koje proliferiraju, trebale ekspimirati telomerazu u S fazi staničnog ciklusa, budući da se u toj fazi replicira stanična DNA. Podaci su pokazali da se ekspresija telomerase događa neovisno o staničnom ciklusu. Aktivnost telomerase ne ovisi o staničnom ciklusu, već o induciranju apoptoze (programirane stanične smrti) i smanjenju indeksa proliferacije stanice. Kinetika opadanja telomerazne aktivnosti je mjerena u tri stanja pri kojima se stanica ne dijeli: terminalna diferencijacija, stanje mirovanja, prestanak rasta uzrokovan stresom. Kod terminalne diferencijacije, aktivnost telomerase se inhibira transkripcijskom represijom te proteolizom telomerase. Aktivnost telomerase opada vrlo brzo, unutar 2-3 dana. Kod mirovanja, aktivnost telomerase opada sporije. Smatra se da je inhibicija aktivnosti telomerase u stanju mirovanja uzrokovana transkripcijskom represijom, bez proteolize enzima. Inhibicija telomerase ulaskom u stanje mirovanja se događa u vremenskom periodu do 14 dana.

Ulaskom limfocita u mitozu dolazi do aktivacije telomerase, što pokazuje da postoji njena uloga u staničnoj proliferaciji. Limfociti s aktivnom telomerazom nisu uspjeli održavati duljinu svojih telomera na dulje vrijeme, što odgovara njihovoj fiziološkoj funkciji. Limfociti su u organizmu kratko aktivirani prisustvom antigena, dok su u istraživanju stalno bili tretirani mitogenim agensima i očekivala se konstantna proliferacija, što nije postignuto. I u ovom istraživanju (Pan i sur., 1997) samo prisustvo telomerase nije nužno značilo i održavanje telomera i produžetak životnog vijeka stanice.

Istraživanja provedena na miševima s nefunkcionalnom telomerazom su pokazala gubitak telomerne DNA od oko 5 kb po generaciji. U 6. generaciji su se pojavili simptomi propadanja i starenja tkiva, nemogućnost razmnožavanja, atrofija spolnih organa. Podaci ovog istraživanja pokazuju da gubitak telomera negativno utječe na proliferaciju i regenerativni potencijal samoobnavljajućeg tkiva. Također je pokazano da je održavanje duljine telomera od presudne važnosti u visoko proliferirajućim stanicama i tkivima (Holt i Shay, 1999).

3. ZAKLJUČAK

Skraćivanje telomera je molekularni mehanizam odgovoran za starenje. Održavanjem duljine telomera može se produljiti životni vijek i zdravlje stanice, ali i cijelog organizma. Enzim telomeraza, koja održava telomere, je visoko eksprimirana u stanicama raka i moguća je nova meta lijekova protiv tumora. Pad aktivnosti telomerase u normalnim stanicama tijekom života je moguć evolucijski mehanizam protiv nastajanja tumora.

4. LITERATURA:

- Aubert, G., Lansdorp, P. M. 2008. Telomeres and Aging. *Physiol Rev* 88: 557-579.
- Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C. P., Morin, G. B., Harley, C. B., Shay, J. W., Lichtsteiner, S., Wright, W. E. 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279:349-352.
- Cooke, H. J., Smith, B. A. 1986. Variability at the telomeres of the human X/Y pseudoautosomal region. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 51: 213-219.
- Cooper, G. M., Hausmann, R. E. 2004. *Stanica: Molekularni pristup*. Medicinska naklada, Zagreb, 738 pp.
- Donehower, L. A. 2002. Does p53 affect organismal aging? *J Cell Physiol* 192: 23-33.
- Greider, C. W., Blackburn, E. H. 1985. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43: 405-413.
- Hayflick, L. 1965. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 37: 614-636.
- Hayflick, L., Moorhead, P.S. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621.
- Holt, S. E., Shay, J. W. 1999. Role of Telomerase in Cellular Proliferation and Cancer. *J Cell Physiol* 180: 10-18.
- Hornsby, P. J. 2006. Short telomeres: cause or consequence of aging? *Aging Cell* 5: 577-578.
- Pan, C., Xue, B. H., Ellis, T. M., Peace, D. J., Diaz, M. O. 1997. Changes in telomerase activity and telomere length during human T lymphocyte senescence. *Exp Cell Res* 231:346-353.
- Shay, J. W., Roninson, I. B. 2004. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene* 23: 2919-2933.
- Shay, J. W., Zou, Y., Hiyama, E., Wright, W. E. 2001. Telomerase and cancer. *Human Mol Genet* 10: 677-685.
- Shiels, P. G., Kind, A. J., Campbell, K. H., Wilmut, I., Waddington, D., Colman, A., Schnieke, A. E. 1999. Analysis of telomere length in Dolly, a sheep derived by nuclear transfer. *Cloning* 1: 119-125.

Tabori, U., Nanda, S., Druker, H., Lees, J., Malkin, D. 2007. Younger age of cancer initiation is associated with shorter telomere length in Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Res* 67: 1415-1418.

Wang, J., Xie, L. Y., Allan, S., Beach, D., Hannon, G. J. 1998. Myc activates telomerase. *Genes Dev* 12:1769-1774.